

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Marko Baruškin

7144/PT

β -glukan kao biofiksator aflatoksina M₁

Modul: Mikrobiologija namirnica

Mentor: prof. dr. sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

β -glukan kao biofiksator aflatoksina M₁

Marko Baruškin, 0058207442

Sažetak: Metode uklanjanja i/ili redukcije mikotoksina koje se koriste u prehrambenoj industriji troše velike količine energije i kemijskih sredstava, stoga biološke metode sve više dobivaju na značaju zbog svoje netoksičnosti i ekološkog aspekta. Cilj ovog rada je bio ispitati djelotvornost komercijalnog β -glukana dobivenog iz zobi i β -glukana izoliranog iz kvaščeve biomase prilikom vezanja aflatoksina M₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka. Obje vrste β -glukana su pokazale sposobnost vezanja AFM₁, iako je β -glukan dobiven iz zobi pokazao malo veću efikasnost vezanja (65%) u odnosu na β -glukan izoliran iz kvasca (63,6%). Također je uočljiva nelinearnost prilikom vezanja toksina tijekom 24 sata β -glukanom iz kvasca u usporedbi s β -glukanom iz zobi, što se može objasniti reverzibilnom reakcijom stvaranja kompleksa AFM₁- β -glukan.

Ključne riječi: aflatoksin M₁, biološke metode, mikotoksini, β -glukan

Rad sadrži: 20 stranica, 2 slike, 2 tablice, 32 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: Iva Čanak, mag. ing.

Datum obrane: Rujan, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

β -glucan as a biofixator of aflatoxin M₁

Marko Baruškin, 0058207442

Abstract: The methods of removing and/or reducing mycotoxins used in food industry consume large amounts of energy and chemical resources, so biological methods are becoming increasingly important due to their non-toxicity and ecological aspects. The aim of this thesis was to investigate the efficacy of commercial β -glucan obtained from oats and β -glucan isolated from yeast biomass on binding aflatoxin M₁ from artificially contaminated milk. Both types of β -glucans demonstrated the ability to bind AFM₁, although β -glucan obtained from the oats showed slightly higher binding efficacy (65%) than β -glucan isolated from yeast (63,6%). There is also notable nonlinearity during 24 hours of toxin binding with β -glucan from yeast compared to β -glucan from oats, which can be explained by the reversible reaction of AFM₁- β -glucan complex formation.

Keywords: aflatoxin M₁, biological methods, mycotoxins, β -glucan

Thesis contains: 20 pages, 2 figures, 2 tables, 32 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph.D. Jadranka Frece, Full professor

Technical support and assistance: Iva Čanak, B.sc.

Defence date: September, 2018

Izrada ovog završnog rada omogućena je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta IP-2016-06-4306.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 Mikotoksini	2
2.1.1 Kontaminacija mikotoksinima	2
2.1.2 Suzbijanje rasta plijesni	3
2.2 Aflatoksini	4
2.2.1 Aflatoksin M ₁	4
2.2.2 Uklanjanje aflatoksina	5
2.3 β-glukan	7
2.3.1 Uklanjanje mikotoksina pomoću β-glukana	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1 Materijali	9
3.1.1 Mikroorganizam	9
3.1.2 β-glukan	9
3.1.3. Aflatoksin M ₁	9
3.1.4 Hranjive podloge	9
3.1.5 Pribor i oprema	9
3.2 Metode	10
3.2.1 Čuvanje mikroorganizama	10
3.2.2 Uzgoj mikroorganizama	10
3.2.3 Priprema kvaščeve biomase	10
3.2.4 Autoliza kvasca	10
3.2.5 Alkalno-kiselinska ekstrakcija β-glukana iz kvaščeve biomase	10
3.2.6 Uklanjanje manoproteina	11
3.2.7 Dobivanje β-glukana u praškastom obliku	11
3.2.8 Vežanje AFM ₁ na β-glukan	11
3.2.9 Uklanjanje kompleksa β-glukan-AFM ₁ iz mlijeka	11
3.2.10 UPLC i spektrometrija masa (MS/MS)	11
4. REZULTATI I RASPRAVA	13
5. ZAKLJUČCI	17
6. LITERATURA	18

1. UVOD

Kontaminacija ljudske hrane i hrane za životinje mikotoksinima jedan je od glavnih prioriteta za hranu i sigurnost ljudi. Prisutnost mikotoksina u hrani i hrani za životinje, ne samo da utječe na ekonomiju već također predstavlja opasnost za zdravlje ljudi i životinja te predstavlja rizik za međunarodnu trgovinu (Oancea i Stoia, 2008.).

Zbog činjenice da prisutnost plijesni i/ili mikotoksina u hrani može biti opasna po ljudsko zdravlje i predstavljati gospodarski problem enormnih razmjera sve je veći naglasak na razvoj metoda redukcije mikotoksina kojima bi se omogućila proizvodnja zdravstveno ispravne hrane (Pleadin i sur. 2014.).

Između ostalih metoda redukcije aflatoksina, poput fizikalnih i kemijskih metoda koje koriste velike količine energije i kemijskih sredstava koja nepoželjno djeluju na okoliš, sve više pažnje je posvećeno biološkim metodama uklanjanja aflatoksina koje uključuju primjenu mikroorganizama i/ili njihovih izolata bez nepoželjnih učinaka.

Biološke metode sve se više proučavaju jer se smatraju sigurnijima u odnosu na fizikalne i kemijske metode. Većina anorganskih adsorbenta ne može adsorbirati široki raspon mikotoksina, može imati nepovoljne učinke na namirnice te smanjiti biodostupnost vitamina i minerala (Gonçalves i sur., 2017).

β -glukan koji se nalazi u staničnoj stijenci kvasca, gljiva i nekih viših biljaka predstavlja ekološki prihvatljivo sredstvo za uklanjanje aflatoksina te se uz njega ne koriste nikakve štetne kemikalije niti nastaju toksični produkti.

Cilj ovog rada bio je ispitati djelotvornost β -glukana izoliranog iz kvašćeve biomase i zobi prilikom vezanja aflatoksina M₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Mikotoksini

Mikotoksini su sekundarni metaboliti male molekulske mase koje proizvode filamentozni fungi poput *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* i *Aspergillus parasiticus* (Moss, 1998).

Ti metaboliti tvore toksigenski i kemijski heterogene nakupine koje se grupiraju i mogu uzrokovati bolesti i smrt ljudi i drugih kralješnjaka, a neki mikotoksini pokazuju toksičnost i prema beskralježnjacima, biljkama i mikroorganizmima (Bennett i Klich, 2003.). Mikotoksini biogenetički i strukturno pripadaju različitim vrstama prirodnih spojeva.

Tvorba mikotoksina ovisi o tri bitna parametra: prisutnosti toksikotvorne plijesni, prikladnosti supstrata za rast plijesni te prikladnim uvjetima okoliša za tvorbu toksina. Najbitniji parametri okoliša su sadržaj vode (a_w -vrijednost), temperatura i vrijeme te oni određuju rast plijesni i kontaminaciju mikotoksinima (Duraković i Duraković, 2003.).

Mikotoksine prirodno sintetizira nekoliko rodova plijesni (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Helminthosporium*) koje mogu kontaminirati ljudsku hranu i hranu za životinje. Do sada je zabilježena kontaminacija mikotoksinima u žitaricama, mahunarkama, uljaricama, mlijeku te čak i u voću i povrću bogatom vodom i hranjivim tvarima (Oancea i Stoia, 2008.). Tri roda sačinjavaju skupinu plijesni koje proizvode najveći broj mikotoksina, posebice u žitaricama, a to su *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Međutim, ne sintetiziraju toksine sve vrste unutar ovih rodova (Bhatnagar i sur., 2004.).

Plijesan odgovorna za sintezu mikotoksina može proizvoditi i više od jednog toksina, a određene toksine mogu sintetizirati različiti rodovi plijesni (Duraković i Duraković, 2003.).

Do danas je poznato preko 400 vrsta mikotoksina, a kao kontaminanti hrane najznačajniji su aflatoksin (aflatoksin B₁ (AFB₁), aflatoksin M₁ (AFM₁)), okratoksini (okratoksin A), zearalenon (ZEA), fumonizini (fumonizin B₁, fumonizin B₂), trihoteceni (T-2 toksin) i patulin (PAT) (HAH, 2013.; Hassan i sur., 2015.).

2.1.1 Kontaminacija mikotoksinima

Mikotoksini mogu ući u prehrambeni lanac čovjeka ili životinja izravnom ili neizravnom kontaminacijom. U izravnoj kontaminaciji, namirnica je osnova za rast toksikotvorne plijesni, dok će se neizravna kontaminacija pojaviti kada su dodaci namirnicama kontaminirani mikotoksinima (Markov i sur., 2010; Frece i sur., 2010)

Kao najvažnije namirnice podložne kontaminaciji mikotoksinima zasigurno su žitarice i sjemenke uljarica. Osim na njima, mikotoksini kao kontaminanti mogu biti prisutni i u namirnicama životinjskog porijekla (meso, mlijeko, mliječni proizvodi) te fermentiranim

namirnicama (sirevi s plemenitim plijesnima, mnoge orijentalne namirnice – „Mizo“ te kontinentalne kobasice) (Markov i sur., 2013).

Mlijeko je jedna od glavnih namirnica u ljudskoj prehrani, a posebno je važno za dojenčad i malu djecu. Pošto AFM₁ nije moguće ukloniti standardnim proizvodnim procesima, čak ni pasterizacijom i sterilizacijom, vrlo je važno osigurati pravilnu kontrolu sirovog mlijeka i mliječnih proizvoda (Bilandžić i sur., 2013.). Pojam *carry-over* upućuje na prijelaz nepoželjnih spojeva iz kontaminirane hrane za životinje u hranu za ljudsku potrošnju. Dokazi *carry-over* efekta povezanog s aflatoksinima pronađeni su u mlijeku, svinjskom tkivu te jajima što predstavlja dodatan rizik izloženosti ljudi aflatoksinima kao potencijalnim uzročnicima sekundarnih aflatoksikoza. 95 % od ukupnih aflatoksina detektiranih u mlijeku odnosi se upravo na AFM₁. (Giovati i sur., 2013.). Zbog svog afiniteta prema proteinima mlijeka, AFM₁ može biti prisutan i uostalim mliječnim proizvodima, a koncentracija AFM₁ ovisi o samom proizvodnom procesu pripreme mliječnih proizvoda, o vrsti proizvoda, udjelu vode i konačnom proizvodu (Markov i sur., 2010.)

2.1.2 Suzbijanje rasta plijesni

Budući da su žitarice i uljarice glavni izvori mikotoksina u prehrambenom lancu životinja te posljedično i ljudi, tvorba mikotoksina ovisit će upravo o postupcima sprečavanja rasta plijesni upravo na tim sirovinama (Duraković i Duraković, 2003.).

Za uspješno suzbijanje rasta plijesni potrebni su postupci koji će spriječavati germinaciju (klijanje) spora plijesni i njihovo širenje u okoliš jer se tvorba toksina zbiva kao funkcija micelija plijesni, a ne njezinih spora te iz tog proizlazi da ako nema porasta plijesni, nema ni sinteze mikotoksina. Sprječavanje rasta plijesni može se provesti uskladištenjem i inhibicijom rasta kemijskim agensima (Duraković i Duraković, 2003.).

Sprečavanje ili inhibicija rasta plijesni u skladištu obavlja se modifikacijom okoliša unutar zrna, tj. sadržaja vode, temperature i plinovite atmosfere. Navedene modifikacije se provode raznim postupcima sušenja zrnja te pohranjivanja u hermetički zatvorenim i reguliranim prostorima s niskom koncentracijom kisika i visokom koncentracijom ugljikova dioksida (Duraković i Duraković, 2003.).

Zaštita zrnja kemijskim agensima dopušta veću fleksibilnost tijekom uskladištenja, smanjuje troškove i povećava brzinu obrade. Djelotvoran agens mora biti iznimno male toksičnosti za sisavce, djelovati u velikom opsegu i u pravilu dugo zadržavati sposobnost inhibicije rasta i razmnožavanja mikroorganizama. Najkorišteniji agens je propionska kiselina koja djeluje kao

antigerminacijski agens jer kada se germinacija već desila, propionska kiselina može biti lakše metabolizirana. Bitan parametar kod tretiranja zrnja kemijskim agensima je jednolika raspodjela sredstva budući da nejednolika raspodjela može omogućiti porast plijesni i njezino širenje na uskladištenom materijalu što može dovesti i do stimuliranja sinteze nekih mikotoksina (Duraković i Duraković, 2003.).

2.2 Aflatoksini

Aflatoksini su toksični spojevi koje sintetizira ograničen broj sojeva plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, a te plijesni su vrlo česti kontaminanti velikog broja namirnica i kreme. To su derivati difuranokumarina koji su sintetizirani poliketidnim putem. (Bennett i Klich, 2003.).

Najvažniji predstavnici aflatoksina su aflatoksini B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂. *Aspergillus flavus* producira aflatoksine B₁ i B₂ na žitaricama, dok *Aspergillus parasiticus* može producirati aflatoksine B₁, B₂, G₁ i G₂ na uskladištenim uljaricama. Aflatoksini M₁ i M₂ su hidroksilirani metabolički produkti aflatoksina B₁ i B₂. Aflatoksini kao derivati kumarina su prirodno fluorescirajući spojevi, vidljivi su u UV-spektru pri valnoj duljini od 365 nm. Imena aflatoksina B i G bazirana su upravo na njihovim fluorescentnim svojstvima; B za plavu (*blue*) i G za zelenu (*green*) fluorescenciju. Termostabilni su i u prirodnom stanju vezani su uz proteine koji ih štite od vanjskih agenata (Perši i sur., 2013.)

2.2.1 Aflatoksin M₁

Aflatoksin M₁ je hepatokarcinogeni metabolit, dobiven hidroksilacijom aflatoksina B₁. Kada se AFB₁ putem kontaminiranog krmiva unese u stoku, biotransformira se u jetri do aflatoksina M₁ (AFM₁) koji se izlučuje u mlijeko, tkivo i biološke tekućine životinja (Prandini i sur., 2009). Iako je AFM₁ oko 10 puta manji toksičan od AFB₁, njegov citotoksični, genotoksični i kancerogeni učinci pokazali su se u nekoliko vrsta (Murphy i sur., 2006). Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC, 2002) je klasificirala AFM₁ ljudskim kancerogenom skupine 1. Osim u mlijeku životinja, aflatoksin M₁ je moguće pronaći i u majčinom mlijeku (Bilandžić i sur., 2013.; Markov i sur., 2010.). Stopa apsorpcije aflatoksina i izlučivanje aflatoksina M₁ u mlijeku varira između pojedinih životinja.

Nakon izloženosti životinja hrani s aflatoksinom B₁ mliječna goveda, ovce i koze već za 5 – 12 sati nakon konzumacije počinju u mlijeko izlučivati aflatoksin M₁. Općenito se smatra da se

otprilike 1-3 % aflatoksina B₁ prisutnog u hrani za životinje pojavljuje kao aflatoxin M₁ u mlijeku, a u mlijeku u prahu od životinja koje su konzumirale aflatoksine nalazi se 8 puta veća količina tog mikotoksina u odnosu na svježe mlijeko (Bilandžić i sur., 2013.; Havranek i sur. 2014.). Aflatoxin M₁ je relativno stabilna molekula u sirovim i obrađenim mliječnim proizvodima i ne može se inaktivirati toplinskim tretmanima poput pasterizacije (Markov i sur., 2010.).

Najveće dopuštene koncentracije aflatoksina M₁ u mlijeku i mliječnim proizvodima razlikuju se od zemlje do zemlje, ali zakonska regulativa u zemljama EU je jedna od najstrožih u svijetu za ovaj mikotoksin i iznosi 0,05 µg/L za konzumno mlijeko. U mnogim zemljama Europe, koje nisu članice EU tako i u zemljama Južne i Sjeverne Amerike, Azije i Afrike dozvoljena količina za aflatoxin M₁ je čak i do deset puta veća i iznosi 0,5 µg/L (Markov i sur., 2010.).

U Republici Hrvatskoj prema Zakonu o kontaminantima, najviša dopuštena količina aflatoksina M₁ u sirovom mlijeku, toplinski obrađenom mlijeku i mlijeku za proizvodnju mliječnih proizvoda iznosi 0,050 µg/kg (NN 39/13). Prema Naredbi o privremenim mjerama u odnosu na sadržaj aflatoksina M₁ u mliječnim proizvodima, neki mliječni proizvodi namijenjeni ljudskoj prehrani mogu sadržavati maksimalnu dopuštenu količinu aflatoksina M₁ i to: jogurt i voćni jogurt 0,100 µg/kg, svježi sir, namazi i polutvrđi sirevi 0,250 µg/kg, tvrdi sirevi 0,450 µg/kg, mlijeko u prahu 0,350 µg/kg (NN 39/13).

2.2.2 Uklanjanje aflatoksina

Metode uklanjanja aflatoksina moguće je podijeliti na fizikalne, kemijske i biološke. Svaka od metoda uklanjanja aflatoksina mora zadovoljiti neke uvjete, a to je da ne smije rezultirati stvaranjem drugih toksičnih tvari ili ostaviti bilo kakve štetne ostatke, nutritivna vrijednost proizvoda ne bi smjela biti ozbiljno promijenjena kao ni poželjna fizikalna i senzorska obilježja, te mora biti ekonomski izvedivo i tehnički primjenjivo (Rustom, 1997.).

Fizikalne metode uključuju ekstrakciju pomoću otapala, adsorpciju te toplinsku inaktivaciju ili inaktivaciju ozračivanjem (Pleadin i sur., 2014.).

Aflatoxini imaju visoku temperaturu raspadanja u rasponu od 237 °C do 306 °C te klasični postupci termičke obrade kao što su kuhanje, prženje i pasterizacija ne mogu ukloniti aflatoksine (Markov i sur., 2010.; Pleadin i sur., 2014.). Aflatoxini su osjetljivi na UV-zračenje. Tretiranjem kikirikijeva ulja UV zračenju za 2 sata je reducirano 40-45 % aflatoksina prisutnih u ulju, a u umjetno kontaminiranom mlijeku aflatoxinom M₁ inaktivirano je 3,6-100 % aflatoksina M₁ (ovisno o duljini tretmana, 2-60 min) (Pleadin i sur., 2014.).

Uporaba kemikalija u svrhu inaktivacije, vezanja ili uklanjanja aflatoksina uključuje propionsku kiselinu, amonijak, bakrov sulfat, benzojevu kiselinu, limunsku kiselinu i neke druge spojeve koji reagiraju s aflatoksinima. Ovi spojevi prevode aflatoksin u manje toksične i mutagene spojeve. Kemijske metode redukcije aflatoksina u načelu se smatraju nepraktičnim i nepoželjnim zbog uvjeta u kojima se reakcije provode i negativnog utjecaja na nutritivna, senzorska i funkcionalna svojstva te su do danas odobrene isključivo samo za smanjenje prisutnosti aflatoksina u krmivima (Pleadin i sur., 2014.). U radu autora Duraković i sur. (2012.) testirani su dehidracetna kiselina (DHA) i njeni nosintetizirani analozi u svrhu uklanjanja AFM₁ iz umjetno kontaminiranog jogurta. Iz rezultata je vidljivo da koncentracije DHA i DHT veće od 0,05 µmol/L uklanjaju 22 do 45 % prisutnog AFM₁ u jogurtu na kraju skladištenja, dok BrDHT u koncentracijama od 0,01 i 0,05 µmol/L nakon 28 dana uklanja 22 do 95 % prisutnog AFM₁ ovisno o vremenu i temperaturi skladištenja (Duraković i sur., 2012.).

Biološke metode uklanjanja ili redukcije aflatoksina temelje se na upotrebi različitih mikroorganizama, kao što su bakterije, kvasci, plijesni, aktinomicete i alge koji mogu metabolizirati, inaktivirati ili vezati aflatoksin (Markov i sur., 2010.; Pleadin i sur., 2014.). Učinkovitost bioloških metoda koje su pokazale mogućnost uklanjanja aflatoksina obično ovisi o specifičnim spojevima koje stvaraju odabrani mikroorganizmi, kompetenciji za hranjive tvari potrebne za stvaranje toksina i stvaranju takozvanih anti-aflatoksigenih metabolita koje proizvode mikroorganizmi (Pleadin i sur., 2014.).

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina mikroorganizama koja se uvelike koristi u proizvodnji i očuvanju fermentiranih proizvoda, no mnogobrojnim istraživanjima dokazano je vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. Iz rezultata istraživanja autora Markov i sur. (2010.) može se zaključiti da standardni soj *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 i izolat *L. delbrueckii* S1 imaju sposobnost uklanjanja znatne količine aflatoksina M₁, iznad 50 %, iz mlijeka u vremenu od 48 sati.

Prema rezultatima El Khoury i sur. (2011.) u vremenu od 2 h nakon inkubacije *Lactobacillus bulgaricus* je vezao 38,7 % AFM₁ u usporedbi sa *Streptococcus thermophilus* koji je uklonio 19,8 % AFM₁. Abbès i sur. (2013.) ispitivali su sposobnost vezanja AFM₁ pomoću *L. plantarum* MON03 i *L. rhamnosus* GAF01 te je utvrđena značajna sposobnost vezanja ovog toksina. Najveću sposobnost vezanja AFM₁, u vremenu inkubacije od 24 h pokazao je *L. rhamnosus* GAF01, preko 94%. Studija iznosi da je bakterijska populacija od 10⁸ CFU/ml vrlo pogodna za vezanje AFM₁ u PBS-u i rekonstituiranom mlijeku (Abbès i sur., 2013.). Dodavanjem pojedinih ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline kao starter kultura u mlijeko mogao bi se smanjiti rizik od kontaminacije mlijeka aflatoksinom M₁ (Markov i sur., 2010.). Iako mehanizam

djelovanja BMK na aflatoksin nije potpuno razjašnjen, pretpostavlja se da je fizikalna povezanost s komponentama bakterijskih staničnih stijenki, uglavnom polisaharida i peptidoglikana, odgovorna za uklanjanje aflatoksina (Corassin i sur., 2012.).

Vezanje aflatoksina pomoću kvasaca je relativno brz i reverzibilan proces, a sposobnost im uvelike varira između vrsta, no općenito je niža nego kod bakterija. Vezanje aflatoksina B₁ pomoću *S. cerevisiae* u tekućem mediju je brz proces te uključuje stvaranje reverzibilnog kompleksa između površine aflatoksina i stanične stijenske kvasca. Brojne studije su pokazale da su upravo struktura i komponente stanične stijenke (peptidoglikani, polisaharidi) odgovorne za vezanje aflatoksina iako sam mehanizam još nije dovoljno razjašnjen (Jalili, 2015.). Prema rezultatima autora Corassin i sur. (2012.) gdje je ispitivana učinkovitost sojeva *S. cerevisiae* i BMK za vezanje AFM₁ može se zaključiti da su stanice *S. cerevisiae* imale veću sposobnost uklanjanja AFM₁ iz mlijeka od sojeva BMK te je uklonjeno 90,3 % tj. 92,7 % prisutnog AFM₁ u mlijeku u vremenu inkubacije od 30 i 60 minuta. Međutim, kada su zajedno korištene stanice kvasca i BMK, učinkovitost uklanjanja AFM₁ iz mlijeka se značajno povećala tijekom inkubacije od 30 min., a kroz vrijeme inkubacije od 60 min. došlo je do potpunog uklanjanja AFM₁, odnosno 100%-tne učinkovitosti. Povećanje učinkovitosti vezanja AFM₁ može se objasniti aditivnim učinkom između *S. cerevisiae* i BMK zbog prisutnosti većeg broja stanica koje su dostupne za vezanje toksina (Corassin i sur., 2012.).

2.3 β-glukan

β-glukani su polisaharidi D-glukoze koji se prirodno nalaze u mnogim prokariotskim i eukariotskim organizmima kao što su bakterije, alge, kvasci, gljive te više biljke poput zobi i ječma (Petraović-Tominac i sur., 2010.).

Glukani su heterogena skupina linearnih, dugolančanih, nerazgranatih polisaharida nastalih polimerizacijom monomera D-glukoze glikozidnim vezama. Makromolekularna struktura glukana ovisi o izvoru i načinu izolacije. Polimer je visoke molarne mase s visoko uređenom uzvojitom strukturom koja može postojati kao jednostruko polimerno vlakno s konformacijom uzvojnice ili kao kompleks tri polimerna vlakna tvoreći trostruku uzvojnicu. Glukani iz gljiva i kvasaca imaju uobičajenu strukturu koja sadrži glavne lance β-D-glukopiranozila povezanih β 1→3 vezom te nasumično raspoređene sporedne lance β-D-glukopiranoznih jedinica povezanih 1→6 vezama (Hromádková i sur., 2003; Špoljarić i sur., 2011; Zekovic i sur., 2005).

β-glukani pokazuju bioaktivna i ljekovita svojstva kao što su imunostimulacija, protuupalno, antimikrobno i antitumorsko djelovanje, djeluju na snižavanje kolesterola, a pokazuju i antidijabetičku i hipoglikemijsku aktivnost. Najvažniji čimbenici za određivanje biološke

aktivnosti β -glukana su stupanj grananja, molekularna masa i konformacija (Zekovic i sur., 2005).

2.3.1 Uklanjanje mikotoksina pomoću β -glukana

Posljednjih godina istraživanja bioloških proizvoda za smanjenje bioraspoloživosti mikotoksina dobivaju na značaju. Ranija istraživanja uključivala su dodavanje kulture živih kvasaca za suzbijanje posljedica aflatoksikoze u peradi. Uočeno je poboljšanje iskoristivosti, poboljšanje prirasta i povećanje imunološkog odgovora. *In vitro* studije pokazale su da stanična stijenka *Saccharomyces cerevisiae* može vezati širok raspon toksina uključujući zearalenon (66,7 %), fumonisin (67,0 %), DON (deoksinivalenol) (12,6 %), okratoksin (12,5 %), citrinin (18,4 %) i T-2 toksin (33,4 %) (Zekovic i sur., 2005).

Dosadašnje studije su pokazale da β -1,3-glukan, a osobito dio molekule sa β -1,6 glukanskim bočnim lancima može regulirati prisutnost aflatoksina. Dodatna istraživanja su otkrila da pod određenim fiziološkim uvjetima, uglavnom temperature, glukan može apsorbirati do 50 % molekula zearalenona (Vetvicka, 2013.).

Daljnja ispitivanja uglavnom su bila usredotočena na interakcije glukana i aflatoksina B₁. Ona su pokazala da je glukan uključen u vezanje na aflatoksin B₁, otkriveno je da su hidroksilne, laktonske i ketonske skupine sudjelovale u formiranju vodikovih veza i van der Waalsovih interakcija između glukana i aflatoksina B₁ (Vetvicka, 2013.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Mikroorganizam

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 20 korišten u ovom radu dio je zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

3.1.2 β -glukan

U ovom radu korišten je komercijalni β -glukan dobiven iz zobi te β -glukan izoliran iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 20.

3.1.3. Aflatoksin M₁

Standard AFM₁ nabavljen je od LGC Promochem (Leeds, UK). Radna otopina AFM₁ pripremljena je razrjeđivanjem standarda, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ u acetonitrilu do 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i pohranjena na 4 °C do izvođenja pokusa.

3.1.4 Hranjive podloge

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj kvasca:

sladni agar, sastava (g/L destilirane vode): sladni ekstrakt 30; agar 17. pH vrijednost podloge je 5.5 ± 0.1 ; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/15 min.

sladni bujon je istog sastava kao sladni agar, samo bez dodanog agara.

3.1.5 Pribor i oprema

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- vibracijska miješalica (Tehnica, Slovenija)
- centrifuga Z 206 A (Hermle, Labortechnik GmbH, Njemačka)
- centrifuga s hlađenjem Z446 (Hermle, Labortechnik GmbH, Njemačka)
- inkubator MEMMERT BE 600 (Memmert GmbH + Co. KG, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)

- tehnička vaga (Sartorius, Njemačka)
- analitička vaga (Sartorius, Njemačka)
- pH – metar (Mettler Toledo, Švicarska)
- spektrofotometar (Thermo Scientific, SAD)
- UPLC-MS/MS (Waters, SAD)

3.2 Metode

3.2.1 Čuvanje mikroorganizama

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* 20 čuva se na +4°C na sladnom agaru. Soj je trajno pohranjen na - 70°C uz dodatak 30% (v/v) glicerola.

3.2.2 Uzgoj mikroorganizama

Soj kvasca uzgojen je u aerobnim uvjetima preko noći u sladnom bujonu pri 28 °C.

3.2.3 Priprema kvašćeve biomase

Kvasac je nacijepjen u sladni bujon i inkubiran preko noći na 28 °C. Nakon uzgoja provedeno je centrifugiranje 4000 rpm/15 min te je dobivena biomasa korištena za daljnje eksperimente.

3.2.4 Autoliza kvasca

Izolacija je provedena iz svježe kvašćeve biomase. 5,5 g biomase pomiješano je s 25 mL vode i termostatirano na 50 °C tijekom 24 sata. Talog je centrifugiran (3000 rpm/10 min) i ispran destiliranom vodom tri puta. Isprani talog je dalje korišten za alkalno-kiselinsku ekstrakciju.

3.2.5 Alkalno-kiselinska ekstrakcija β-glukana iz kvašćeve biomase

Na prethodno dobivenu biomasu dodan je 1M NaOH u omjeru 1:5 (w:v). Alkalna ekstrakcija je provedena u kupelji (90 °C / 1 h) uz povremeno miješanje. Talog je centrifugiran (3000 rpm/ 10 min) i ispran destiliranom vodom tri puta. Zatim je dodana 4% fosfatna kiselina u omjeru 1:5 (w:v). Kiselinska ekstrakcije je provedena tijekom 2 sata uz povremeno miješanje. Dobiveni talog je centrifugiran (3000 rpm/ 10 min) i ispran destiliranom vodom tri puta.

3.2.6 Uklanjanje manoproteina

U kivete s talogom dobivenim ekstrakcijom, dodan je citratni pufer, pH 6.8 do 40 mL. Sadržaj je prebačen u staklenu tikvicu i autoklaviran 90 min na 121 °C. Talog je nakon toga centrifugiran (3000 rpm/ 10 min) i ispran destiliranom vodom tri puta.

3.2.7 Dobivanje β -glukana u praškastom obliku

Talog dobiven nakon uklanjanja manoproteina resuspendiran je u trostruko volumenu 96% etanola. Nakon centrifugiranja (3000 rpm/ 10 min) talog je prenesen u Petrijeve zdjelice i ostavljen na sušenju preko noći.

3.2.8 Vežanje AFM₁ na β -glukan

β (1,3 i 1,4)-glukan u prahu dobiven iz zobi i β -glukan izoliran iz kvasca *S. cerevisiae* 20 u koncentraciji od 0,01% i 0,005% korišteni su za vežanje AFM₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka u koncentraciji od 0,50 μ g/kg uzorka. Alikvoti su uzimani nakon 0-tog, 2.,4. i 24. h inkubacije.

3.2.9 Uklanjanje kompleksa β -glukan-AFM₁ iz mlijeka

Uklanjanje kompleksa β -glukan-AFM₁ provelo se centrifugiranjem uzorka pri 2000 rpm u filteru Centricon Plus-70 (Merck Millipore, Njemačka), MWCO 100 kDa, maksimalnog volumena 70 mL, a količina nevezanog AFM₁ određena je kombiniranom metodom tekućinske kromatografije višestruke spektrometrije masa (UP)LC-MS/MS.

3.2.10 UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) - Tekućinska

kromatografija ultravisoke djelotvornosti i spektrometrija masa (MS/MS)

Prije UPLC analize, uzorci su pročišćeni imunoafinitetnim kolonama (Vicom) uz dodatak 10 mL PBS pufera. Brzina protoka nije prelazila 3 mL/min. Nakon ispiranja kolona s 10 mL destilirane vode i sušenja u vakuumu, AFM₁ je eluiran s 4 mL acetonitrila. Prikupljeni eluat uparen je u struji dušika. Koncentracija preostalog AFM₁ u uzorcima određena je sustavom (UP)LC-MS/MS, tip Waters Xevo TQ MS.

Uvjeti rada:

Pokretna faza: 0,1 % Mravlje kiseline u vodi (A)

0,1 % Mravlje kiseline u acetonitrilu (B)

Kolona: BEH C₁₈ 2,1 x 100 mm x 1,7µm

Predkolona: BEH C₁₈ 2,1 x 5 mm x 1,7µm

Protok pokretne faze: 0.25 ml min⁻¹

Temperatura kolone: 40 °C

Volumen analiziranog uzorka: 20 µl

Vrijeme eluiranja: 10 minuta

LC program

vrijeme, min	A, %	B, %
početno	80	20
0.50	80	20
2.00	10	90
5.00	10	90
5.01	90	10
6.00	90	10
6.10	80	20
10.00	80	20

MS/MS

Pozitivna ionizacija elektroraspršivanjem uz grijanje (H-ESI(+)) se koristi prije MRM snimanja na MS/MS gdje se prate fragmentni ioni određenog m/z nastali disocijacijom protoniranog molekuskog iona (M+H⁺) induciranom kolizijom s atomima inertnog plina (329→ 229, 329→ 273).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U posljednje vrijeme sve veći naglasak se stavlja na razvijanje bioloških metoda za uklanjanje aflatoksina iz hrane za ljude i za životinje. Biološke metode uklanjanja aflatoksina uključuju skupine mikroorganizama i/ili njihovih izolata koji imaju sposobnost stvaranja kompleksa sa aflatoksinom. Osim detaljnije istraženih mikroorganizama, poput bakterija mliječne kiseline i kvasaca, velik potencijal za uklanjanje aflatoksina ima i β -glukan koji je sastavni dio staničnih stijenki kvasaca, gljiva te nekih viših biljaka, kao takav predstavlja dobru alternativu tradicionalnim fizikalnim, kemijskim i fizikalno-kemijskim metodama redukcije aflatoksina (Karazhiyan i sur., 2016).

Biološke metode uklanjanja ne koriste dodane kemikalije koje bi mogle nepovoljno utjecati na okoliš, a spriječeno i je nastajanje nepoželjnih nusprodukata u namirnici koji bi mogli narušiti zdravstvenu ispravnost i senzorska svojstva hrane te samim time nepovoljno utjecati na zdravlje ljudi (Yiannikouris i sur., 2006).

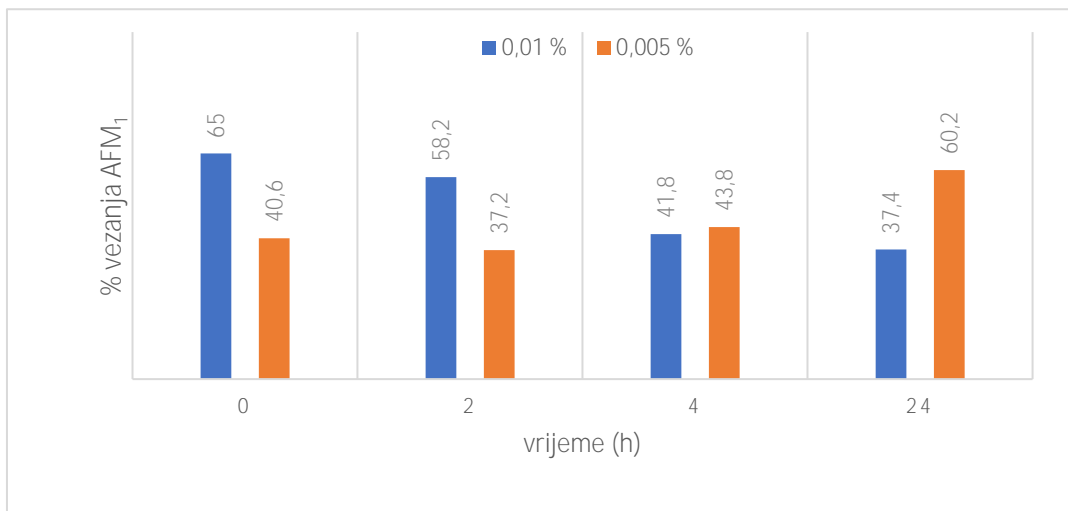
Cilj ovog rada bio je ispitati sposobnost vezanja AFM₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka pomoću β -glukana izoliranog iz zobi te iz stanične stijenke kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 20. Ispitane su dvije koncentracije β -glukana (0,01% i 0.005%) a rezultati vezanja su prikazani u tablici 1 i tablici 2. Početna koncentracija AFM₁ u mlijeku iznosila je 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dodatkom β -glukana izoliranog iz zobi, najbolje vezanje pri koncentraciji od 0.01% ostvareno je u nultom satu i iznosi 0,325 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM₁, dok je za nižu koncentraciju (0.005%) 0,301 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM₁ vezano nakon 24 sata (tablica 1). Najbolje vezanje β -glukanom iz kvasca dobiveno je nakon 24 sata, u vrijednosti od 0,254 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM₁ za koncentraciju 0,01%, dok je najbolje vezanje za nižu koncentraciju navedenog β -glukana zabilježeno u nultom satu (0,318 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFM₁) (tablica 2).

Tablica 1. Koncentracija AFM₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) uz dodatak β -glukana dobivenog iz zobi tijekom 24 sata

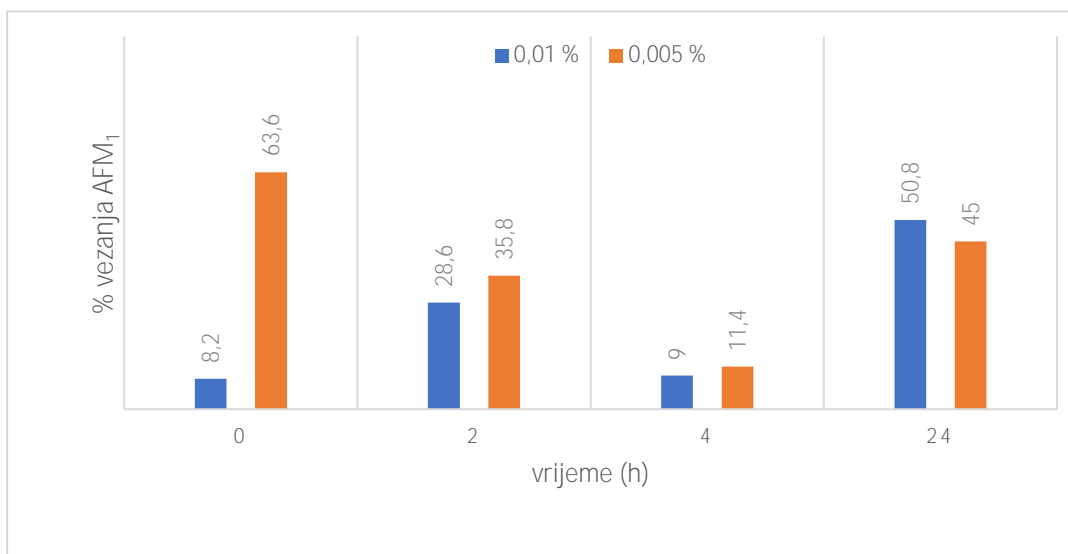
vrijeme (h)	Koncentracija vezanog AFM ₁ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	0,01 %	0,005%
0	0,325	0,203
2	0,291	0,186
4	0,209	0,219
24	0,187	0,301

Tablica 2. Koncentracija AFM₁ (μg/kg) uz dodatak β-glukana dobivenog iz kvasca tijekom 24 sata

	Koncentracija vezanog AFM ₁ (μg/kg)	
vrijeme (h)	0,01 %	0,005%



Slika 1. Postotak vezanja AFM₁ β-glukanom iz zobi



Slika 2. Postotak vezanja AFM₁ β-glukanom iz kvasca

Iako je sam mehanizam vezanja AFM₁ na β -glukan još uvijek nepoznat, u istraživanju Yiannikouris i sur. (2006) se navodi kako je veza između β -glukana i u radu opisanih mikotoksina (aflatoksin B₁, deoksinivalenol i patulin) uključivala interakciju van der Waalsovih sila te stabilnu intermolekularnu vodikovu vezu koja uključuje hidroksilne, laktonske i ketonske skupine koje su uglavnom prisutne u mikotoksinima, koje doprinose stabilnosti kompleksa mikotoksin – β -glukan. Navodi se kako su uvjeti okoline, poput pH vrijednosti uz stereokemiju i hidrofobna svojstva mikotoksina, od primarne važnosti za stvaranja mikotoksin – β -glukan kompleksa i određuju afinitet mikotoksina prema β -glukanu, što bi se moglo primijeniti i na AFM₁.

Međutim, valja napomenuti da se većina prethodnih istraživanja usredotočila na druge mikotoksine pa nema puno podataka za usporedbu s našim rezultatima te su potrebna daljnja ispitivanja u području biološkog uklanjanja AFM₁.

5. ZAKLJUČCI

1. Obje vrste β -glukana imaju sposobnost vezanja AFM₁, iako je β -glukan iz zobi pokazao nešto bolju sposobnost vezanja AFM₁ iz umjetno kontaminiranog mlijeka u odnosu na β -glukan izoliran iz kvasca.
2. Razlike u vezanju AFM₁ beta-glukanom iz zobi i kvasca najvjerojatnije su posljedica različite građe i razgranatosti molekula.
3. Zbog još uvijek nerazjašnjenog mehanizma vezanja AFM₁ na β -glukan i nedovoljnog broja istraživanja provedenih u tom području, potrebna su daljnja ispitivanja s ciljem shvaćanja mehanizma vezanja i uklanjanja AFM₁ biološkim metodama.

6. LITERATURA

1. Abbès, S., Salah-Abbès, J.B., Sharafi, H., Jebali, R., Noghabi, K.A., Oueslati, R. (2013) Ability of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM₁ in vitro and to counteract AFM₁ immunotoxicity in vivo, *Journal of Immunotoxicology*, **10**(3): 279-286.
2. Bennett, J. W., Klich, M. (2003) Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, **3**: 497–516.
3. Bilandžić, N., Božić, Đ., Đokić, M., Sedak, M., Solomun Kolanović B., Varenina, I., Cvetnić, Ž. (2013) Assessment of aflatoxin M₁ contamination in the milk of four dairy species in Croatia, *Food Control*, **43**: 18-21.
4. Bilandžić, N., Varenina, I., Božić, Đ., Sedak, M., Đokić, M., Solomun Kolanović B., Cvetnić, Ž. (2013) Aflatoksin M₁ u mlijeku i mliječnim proizvodima, *Veterinarska stanica* **44**(3): 195-203.
5. Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R.E., Oliveira, C.A.F. (2012) Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M₁ in UHT skim milk, *Food Control*, **31**: 80-83.
6. Duraković, L., Delaš, F., Tudić, A., Huić-Babić, K., Redžepović, S. (2012) Removal of aflatoxin M₁ from artificially contaminated yoghurt by using of new synthesized dehydroacetic acid analogues, *Mljekarstvo*, **62**(3): 179-191.
7. Duraković, S., Duraković, L. (2003) Mikologija u biotehnologiji, Kugler, Zagreb.
8. El Khoury, A., Atoui, A., Yaghi, J. (2011) Analysis of aflatoxin M₁ in milk and yogurt and AFM₁ reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry, *Food Control*, **22**: 1695-1699.
9. El-Arab, A.E., Foheid, S. and El-Said, M. (2009) Effect of yeast and botanical beta-glucan on serum lipid profile and cecum probiotic bacteria using rats fed cholesterol diet, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **59**(2): 169-174.
10. Frece, J., Markov, K., Čvek, D., Kovačević, D., Delaš, F. (2010) Autochthonous functional starter cultures and mycotoxins in "Slavonski kulen", *Book of Abstracts, Ružička days 13th Today Science- Tomorrow Industry* / Šubarić, Drago (ur.). Osijek : Faculty of Food Technology Osijek ; Croatian Society of Chemical Engineers, 59-59.
11. Giovati, L., Magliani, W., Ciociola, T., Santinoli, C., Conti, S., Polonelli, L. (2015) AFM₁ in Milk: Physical, Biological, and Prophylactic Methods to Mitigate Contamination, *Toxins*, **7**(10): 4330-4349.
12. Gonçalves, B.L., Gonçalves, C., Rosim, R.E., Oliveira, C.A.F., Corassin, C.H. (2017) Evaluations of Different Sources of *Saccharomyces cerevisiae* to Binding Capacity of

- Aflatoxin B1 Utilizing their Adsorption Isotherms, *Journal of Food Chemistry & Nanotechnology*, **3**(4): 126-132.
13. HAH (2013) Što su mikotoksini?. HAH - Hrvatska agencija za hranu, Pristupljeno 30. svibnja 2017. <<https://www.hah.hr/sto-su-mikotoksini/>> Pristupljeno 27. veljače 2018.
 14. Hassan, Y. I., Zhou, T., Bullerman, L., B. (2014) Sourdough lactic acid bacteria as antifungal and mycotoxin-controlling agents, *Food Science and Technology International*, **22**(1): 79–90.
 15. Havranek, J., Tudor Kalit, M. i suradnici (2014.) Sigurnost hrane od polja do stola, M.E.P. d.o.o., Zagreb
 16. Hromádková, Z., Ebringerová, A., Sasinková, V., Šandula, J., Hříbalová, V., Omelková, J. (2003) Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1→3)-β-d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*, *Carbohydrate Polymers*, **51**(1): 9-15.
 17. Jalili, M. (2015) A Review on Aflatoxins Reduction in Food, Iranian Journal of Health, *Safety & Environment*, **3**(1): 445-459.
 18. Karazhiyan, H., Mehraban Sangatash, M., Karazhyan, R., Mehrzad, A., Haghighi, E. (2016) Ability of Different Treatments of *Saccharomyces cerevisiae* to Surface Bind Aflatoxin M1 in Yoghurt, *J. Agr. Sci. Tech*, **18**: 1489-1498.
 19. Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., Delaš, F. (2010.) Aflatoksin M1 u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline, *Mljekarstvo* **60**(4): 244-251.
 20. Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D., Frece, J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products, *Food control*. **34**(2), 312-317.
 21. Naredba o privremenim mjerama u odnosu na sadržaj aflatoksina M₁ u mliječnim proizvodima, *Narodne novine*, 39/2013.
 22. Oancea, S., Stoia M. (2008) Mycotoxins: a review of toxicology, analytical methods and health risks, *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*, **1**: 19-36 .
 23. Perši, N, Pleadin, J., Vulić, A., Zadravec, M, Mitak, M. (2011.) Mikotoksini u žitaricama i hrani životinjskog podrijetla, *Veterinarska Stanica* **42**(4): 335-345.
 24. Petravić-Tominac, V., Zechner-Krpan, V., Grba, S., Srećec, S., Panjkota-Krbavčić, I., Vidović, L. (2010) Biological Effects of Yeast β-Glucans, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, **75**(4): 149-158.

25. Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2014.) Aflatoksini - Onečišćenje, učinci i metode redukcije, *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **9**(3-4): 75-82.
26. Rahaie, S., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S. H., Mazaheri, M. (2012) Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GGnin pistachio nuts, *International Journal of Food Science and Technology*, **47**(8): 1647-1653
27. Rustom, Y. S. I. (1997) Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods, *Food Chemistry*, **59**(1): 57-67.
28. Špoljarić, D., Fumić, T., Kezić, D., Valpotić, H., Fabijanić, V., Popović, M., Sladoljev, S., Mršić, G., Valpotić, I. (2011.) β -glukani: Prirodni modifikatori imunskog odgovora nedovoljno poznati u veterini, *Veterinarska stanica* **42**(4): 361-376.
29. Vetvicka, V. (2013) Effects of β -glucan on some environmental toxins: An overview, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, **158**(1): 1-4.
30. Yiannikouris, A., Andre, G., Poughon, L., Francois, J., Dussap, C.-D., Jeminet, G., Bertin, G., Jouany, J.-P. (2006) Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with β -D-Glucans, *Biomacromolecules*, **7**: 1147-1155.
31. Zakon o kontaminantima, *Narodne novine*, 39/2013.
32. Zeković, B. D., Kwiatowski, S., Vrvić, M. M., Jakovljević, D., Moran, A. C. (2005) Natural and Modified (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation, *Critical Reviews in Biotechnology*, **25**: 205–230.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in blue ink, reading "Marko Peradić", written over a horizontal line.

ime i prezime studenta